

THESIS

MUNICH

1963

**Verhalten von Heparin im Blut
und im Harn nach
parenteraler Injektion**

William Wagenbrenner

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

**Verhalten von Heparin im Blut
und im Harn nach
parenteraler Injektion**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
William Wagenbrenner
aus New York

München 1963

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. N. Zöllner
Mitberichterstatter:	Professor Dr. W. Seitz
Dekan:	Professor Dr. A. Herrmann

Tag der mündlichen Prüfung: ~~2. Juli 1963~~

18. JUNI 1963

MEINER TOCHTER

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	5
METHODIK	5
STANDARDKURVEN	6
HEPARIN IM BLUT IN vitro	6
Verhalten des Heparins während der ersten Stunde	6
ERGEBNISSE	8
Verhalten des Heparins während längere Beobachtungsperioden	9
ERGEBNISSE	10
HEPARIN IM HARN	10
ERGEBNISSE	11
DISKUSSION	12
LITERATURVERZEICHNIS	13

EINLEITUNG

Im Folgenden wird über eine Versuchsreihe berichtet, deren Ziel die Feststellung des Schicksals von exogenem Heparin nach parenteraler Injektion in das Blutgefäßsystem des Menschen war. Die von Zöllner, Burger und Braun (1) entwickelte Methode wurde verwendet. Heparin wurde mit 9 Aminoacridin gefällt. Nach unseren Messungen fällt diese Substanz frischem Plasma zugesetztes Heparin quantitativ; dagegen wird nur eine minimale Menge Protein präcipitiert, so daß eine Eiweißabtrennung mit Phenol oder ähnlichen Substanzen nicht nötig ist (1). Der Plasmaspiegel von Heparin während und nach der ersten Stunde nach parenteraler Injektion wurde bei sechs Personen bestimmt. An sechs weiteren Personen wurden Heparinkonzentrationen bis sechs Stunden nach Injektion gemessen und der gesammelte Harn auf Heparin untersucht. Um zu klären, ob exogenes Heparin im Blut in die Zellen eintritt oder ob es im Plasma bleibt, wurden zuerst in vitro Versuche über das Verhalten von Heparin im Vollblut gemacht.

METHODIK

Zur Gewinnung von Oxalatplasma wurden für 10 ml Blut 0,1 ml 30 % wässriger Kaliumoxalatlösung einem Reagenzglas zugesetzt und getrocknet. Blut wurde aus der Vene entnommen, gleich nach Zugabe wurde gemischt, zentrifugiert und dekantiert. Auch nach Heparininjektion wurde Oxalat zugesetzt, um die Gleichmäßigkeit der Versuchsreihe zu gewährleisten.

PRÄPARATE

- a. Heparin: Liquemin der Firma Deutsche Hoffman La Roche AG
- b. 9 Aminoacridin der Farbwerke Hoechst AG, eine 0,4% wässrige Lösung.
- c. Azur A der Firma Theodor Schuchard GmbH München
- d. 0,05 M Natriumacetatpuffer pH 5,9
- e. 0,2 N Naoh
- f. NaKPO_4 Pufferlösung 0,15 M, pH 7,3, 24 gram/liter

ISOLIERUNG DES HEPARINS

Zu 1 ml Plasma wurden 3 ml Natriumacetatpuffer und 0,6 ml 9-Aminoacridinlösung zugesetzt und gründlich gemischt. Dann wurde hochtourig zentrifugiert (19.000 g) 16 Minuten.

Der Überstand wurde mittels einer Pipette mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Das Sediment wurde mit 4 Tropfen NaOH Lösung gelöst oder suspendiert. 1,8 ml H₂O wurde zugegeben und mit circa 8 ml Äther 4 mal ausgeschüttelt, um das Aminoacridin zu entfernen. Wenn das Sediment nicht ganz aufgelöst war, wurde die Suspension 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen und erneut ausgeschüttelt. Der Rest des Äthers wurde mit ein Stickstoffstrom auf die Flüssigkeits-Oberfläche entfernt. Das Gesamtvolumen wurde auf 2 ml gebracht, filtriert und 1 ml des Filtrats zur metachromatischen Heparinbestimmung verwendet. Die anschließende metachromatische Bestimmung von Heparin erfolgte im Wesentlichen nach Jacques et al (2). Nähere Angaben finden sich bei Zöllner et al (1). Ein Zeiss Spectrophotometer wurde gebraucht. Zu der Küvette wurden 1 ml Phosphatepuffer, 0,5 ml der Azurlösung und zuletzt 1 ml der Heparin Lösung. Die Messung in der 1 cm-Küvette erfolgte umgehend nach dem Heparin Zusatz.

STANDARDKURVEN

Für jede Person wurde eine Standardkurve errichtet. Standardlösungen mit Heparinkonzentrationen von 5, 2,5, und 1,25 International Einheiten (IE) pro 0,1 ml physiologische Kochsalzlösung wurden vorbereitet. Zu jeder der drei Konzentrationen wurden 1 ml Plasma zugegeben und bestimmt. Um die endogene Metachromasie zu bestimmen, wurde gleichzeitig ein Plasma ohne Heparin Zusatz (Leerplasma) die Bestimmung mit in eingesetzt. Das Resultat war eine Gerade, die die Ordinate beim Extinctionswert der endogenen Metachromasie schnitt.

Die Standardkurven mit Heparin in aqua destillata und physiologische Kochsalzlösung ohne vorangehende Aminoacridinfällung ergaben einen Eichwert von durchschnittlich 0,446 für 2,5 IE Heparin mit einer Streuung von 0,009. Die Standardkurven für elf der Versuchspersonen ergaben Geraden durch 0,448 mit einer Streuung von 0,013 nach Abzug der Leermetachromasie. Das ist eine Genauigkeit von 0,1 IE Heparin, und wir mußten daraus schließen, daß sämtliches Heparin mit Aminoacridin ausgefällt worden war.

ERGEBNISSE

VERHALTEN VON HEPARIN IM BLUT IN VITRO

Ehe man das Verhalten von Heparin in Plasma feststellen konnte, war es nötig, zu bestimmen, ob Heparin ausschließlich im Plasma blieb.

Zu einem gemessenen Volumen von frischem Blut wurde eine gemessene Menge Heparin zugesetzt. Nachdem das Blut bei Körpertemperatur verschiedene Zeiten gestanden hatte, wurde das Plasma von den Zellen getrennt und in 1 ml sein Heparin Gehalt bestimmt.

Eine Musterbestimmung: Zu 2 ml Oxalatblut wurden 5 IE Heparin in 0,1 ml physiologische Kochsalzlösung zugegeben. Das Blut wurde 15 Minuten

bei 37 grad C gehalten. Gesamtvolumen jetzt 2,1 ml, Hämatokrite 45. Gesamtplasmamenge in der Probe 1,1 + 0,1 Heparinlösung = 1,2 ml. Die Metachromasie ergab eine Heparinkonzentration von 3,9 IE pro ml. Die theoretische Konzentration, wenn sämtliches Heparin im Plasma geblieben wäre, beträgt 4,15 IE pro ml. Eine Tabelle weiterer Ergebnisse folgt. Der Befund, daß Heparin in vitro im Plasma bleibt, stimmt mit Arbeiten anderer Untersucher überein (3). Eine mit der angewandten Methode meßbare Quantität von Heparin also tritt nicht in den Zellen ein.

Person	Heparin zugegeben in IE	Heparin gefunden
A	4,5	4,7
B	2,3	2,2
C	1,1	1,2
D	2,5	2,5
E	3,4	3,2
F	5,0	5,2
G	4,0	3,5

VERHALTEN DES HEPARINS WÄHREND DER ERSTEN STUNDE NACH INJEKTION.

Sechs nüchterne gesunde Versuchspersonen wurden für diesen Versuch gebraucht. Vor der Zufuhr von Heparin wurden 20 ml Blut entnommen, um die Leermetachromasie und die Standardkurve zu bestimmen. Dann wurde eine gemessene Heparinmenge zwischen 19600 und 20050 IE intravenös injiziert. In Abständen wurden etwa 10 ml Blut wiederholt entnommen und Heparin bestimmt. Die Metachromasiewerte wurden die individuellen Eichkurven abgelesen.

Das Plasmavolumen von drei der Versuchspersonen wurde mit der Evansblau Methode bestimmt +. Die Anfangskonzentrationen des injizierten Heparins wurden berechnet. Das Plasmavolumen der anderen drei Personen wurde aus dem Körpergewicht berechnet (Faktor 0,05). Aus der Menge des injizierten Heparins und dem Abfall des Plasmaspiegels wurde der Prozentsatz von Heparin, der während der ersten Stunde aus der Blutbahn eliminiert wurde, berechnet.

BESTIMMUNG DER ANFANGSKONZENTRATION

Person	Gewicht in kg	Plasmavolumen	Anfangskonzentration = Menge injiziert/ Plasmavolumen
8	67	3000	6,6 IE/ml
10	75	3340 +	5,9

+ Herrn Dr. König bin ich für die Bestimmung zu Dank verpflichtet.

11	67,2	3000	6,1
13	65	2900	6,6
12	76,5	3370 +	6,1
14	63	2840	6,1

VERHALTEN WÄHREND DER ERSTEN STUNDE

Person und Heparin- menge injiziert		Minuten nach Injektion		Eichwert und IE/ml Plasma
8	20050 IE	3	0,395	4,1
		6	0,330	3,4
		10	0,320	3,2
		15	0,320	3,2
		30	0,300	3,0
		58	0,160	1,4
10	19700 IE	4	0,385	4,0
		8	0,350	3,6
		16	0,280	2,8
		30	0,260	2,6
		45	0,205	2,0
		60	0,178	1,7
11	19600 IE	8	0,380	4,0
		12	0,370	3,8
		23	0,350	3,6
		31	0,285	2,9
		41	0,250	2,6
		51	0,220	2,2
		55	0,220	2,2
12	20000 IE	4	0,390	4,1
		10	0,320	3,3
		20	0,315	3,2
		30	0,310	3,1
		40	0,300	3,0
		48	0,265	2,6
		55	0,250	2,4
13	19850 IE	4	0,400	4,8
		11	0,302	2,7
		20	0,260	2,3
		31	0,252	2,3

+ Plasmavolumen bestimmt.

		45	0,241	2,1
		70	0,218	1,8
14	19700 IE	4	0,340	3,5
		11	0,300	3,0
		20	0,310	3,1
		30	0,270	2,7
		45		
		60	0,160	1,5

Person % während der ersten Stunde aus der
Blutbahn

12	61
13	70
14	76
11	67
10	73
8	79

Durchschnitt 71 %

VERHALTEN DES HEPARINS WÄHREND LÄNGERE BEOBACHTUNGSPERIODEN.

Sechs Personen wurden für diesen Versuch gebraucht. Versuchstechnik wie oben.

Person und Menge injiziert	Stunden nach	Eichwert/0,5 ml Plasma	IE/ml Plasma
1 20300 IE	0,25	0,270	2,7
	0,50	0,230	2,2
	1	0,200	1,8
	2	0,180	1,4
2 19400 IE	0,085	0,430	4,1
	0,25	0,335	3,2
	1	0,255	2,2
	2	0,145	1,1
	6	0,080	0,4
3 20050	0,085	0,480	4,7
	0,25	0,310	2,7
	1	0,230	1,9
	4	0,125	0,7

5	19700	0,085	0,400	3,9
		0,333	0,275	2,5
		1	0,165	1,3
		2	0,145	1,1
		5	0,055	0,1
6	20450	0,085	0,385	3,8
		0,25	0,330	2,9
		1	0,210	1,7
		2	0,135	0,8
		5	0,090	0,3
7	17000	0,10	0,320	3,2
		0,25	0,270	2,6
		1	0,180	1,5
		2	0,135	1,0
		4	0,090	0,4

Vom Heparin, daß noch in der Blutbahn war, % ausgeschieden vom Ende der ersten Stunde bis zum Ende der zweiten Stunde.

Person	% ausgeschieden
3	37
1	23
2	50
5	28
6	50
7	33
Durchschnitt 37 %	

Vom Heparin, daß noch in der Blutbahn am Ende der zweiten Stunde war, % ausgeschieden vom Ende der zweiten Stunde bis zum Ende der vierten Stunde.

Person	% ausgeschieden
3	42
6	55
7	48
2	49
5	61
Durchschnitt 50 %	

HEPARIN IM HARN

Von den Versuchspersonen wurde Harn gesammelt und zwar zwischen 1 und 7 Stunden nach parenteraler Injektion. Der Harn wurde zentrifugiert, 1:20

verdünnt mit aqua destillata und der Heparin Gehalt metachromisch bestimmt.

Der in der gleichen Weise behandelte Harn von Gesunden zeigte keine Metachromasie. Im Harn von 15 Patienten betrug die Metachromasie zwischen 0,001 und 0,002 mit einem Durchschnitt von 0,001. Das entspricht einer unwesentlichen endogenen Metachromasie, wenn der Befund mit der Metachromasie des Harnes von Versuchspersonen, die Heparin enthalten haben, verglichen wird. Um die Wirkung von Salzen und anderen physiologischen Bestandteilen des Harnes auf die Metachromasie zu prüfen, wurde einer 100 ml Portion von normalem Harn, der keine Metachromasie zeigte, mit physiologischen Konzentrationen von Phosphat (4), Chlorid, Natriumbisulfat, Ammoniac, Citrat, Biphosphat und Harnstoff versetzt. Keine Metachromasie wurde beobachtet. Es war keine Abweichung von der Standardkurve festzustellen. Auch Rinderalbumin hat keine Änderung der Standardkurve verursacht.

Substanz	Gram zugegeben
Harnstoff	2,0
Citrat	0,015
Ammoniac	0,06
Chlorid	1,0
als Natriumchlorid	
Bisulfat	0,21
Phosphat	0,20

ERGEBNISSE

Person	Zeit nach Injektion in Stunden	Harn Menge und Konzentration	Liquemin injiziert	% Ausge- schieb.
9	2	125 ml 22,0 IE/ml	16500 IE	16
10	1,33	625 11,0	19700	35
14	2	330 23,0	19700	37
8	1,33	150 20,2	20050	15
11	5	270 34,0	19600	45
13	7,25	425 23,3	19850	50

Die Eichkurven für Heparin in aqua destillata, physiologischer Kochsalzlösung, 1:20 mit aqua destillata verdünntem Harn, und menschliche Plasma minus Leermetachromasiebestimmung waren innerhalb der Fehler der Methode identisch.

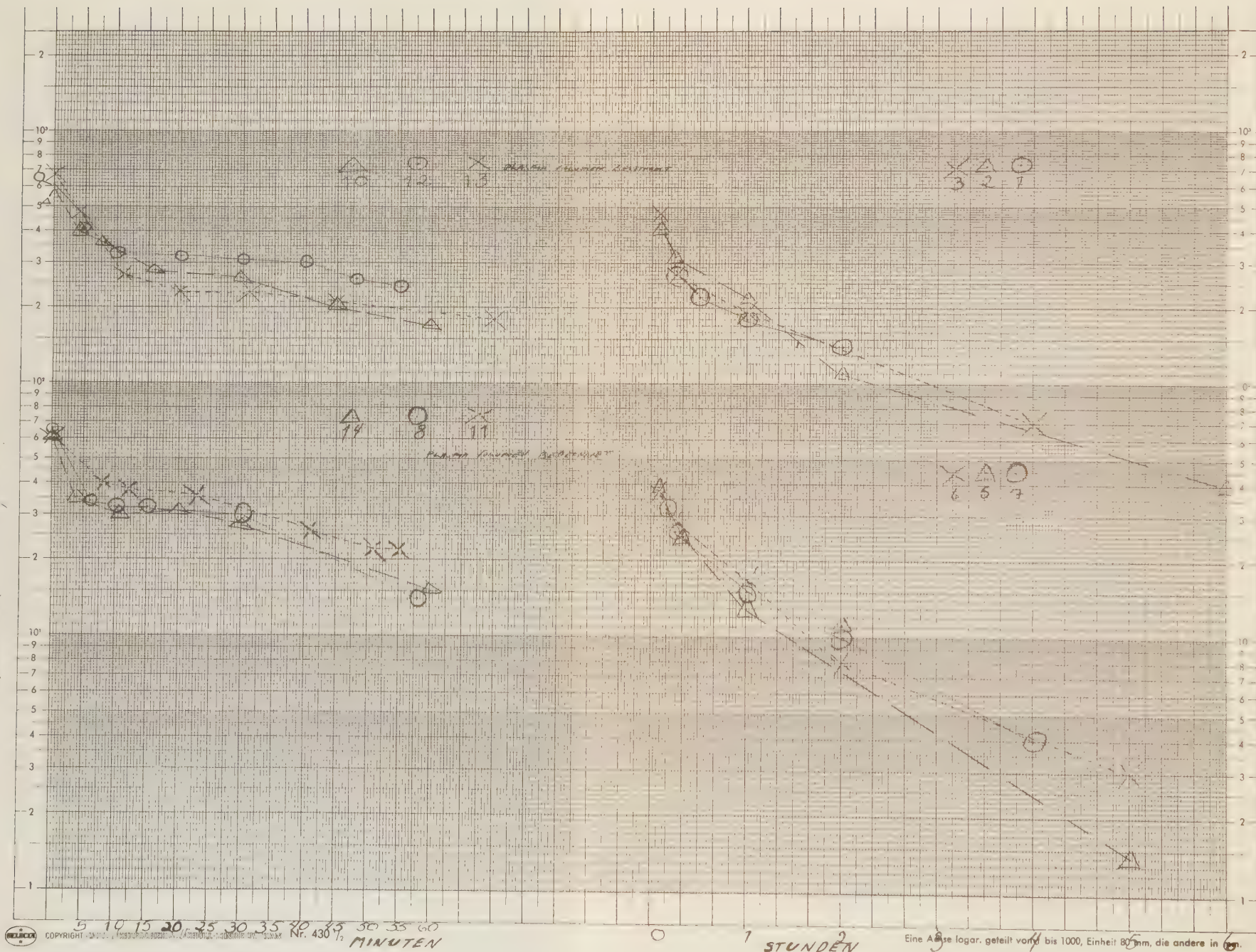
DISKUSSION

Heparin wird sehr schnell aus der Blutbahn eliminiert und zum großen Teil durch die Niere ausgeschieden. Der steile Abfall während der ersten 15 Minuten zeigt, daß Heparin in einen Raum, der größer als das Plasmavolumen ist, verteilt wird. Da nur ein Teil des Heparins im Harn erscheint, muß angenommen werden, daß die Substanz entweder allmählich in andere Räume übertritt oder im Stoffwechsel abgebaut wird. Ungefähr 12 Minuten nach Zufuhr beträgt die Heparinkonzentration im Plasma noch 50 % der für den Zeitpunkt der Injektion errechneten theoretischen Konzentration. Nach 1,7 Stunden hat der Heparinspiegel auf 20 % der Anfangskonzentration abgenommen. Insgesamt zeigen die Befunde, daß Heparin sehr rasch aus dem Blut eliminiert wird.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Zöllner N., Bürger R., und Braun C., Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band 329, S. 76-83, 1962
2. L.B. Jaques, F.C. Monkhouse und M. Stewart, Journal of Physiology 109, 41 (1949)
3. "Physiologic Factors Concerning the Remittance of Injected Heparin from Circulating Blood" Monkhouse, F.C.
Journal of Physiology 1954.
4. "Physiological Basis of Medical Practise", Best and Taylor, S.465, 1955.

IE LIQUEMIN / ML PLASMA



Am Schluss meiner Arbeit darf ich mir erlauben, Herrn Prof. Dr. Nepomuk Zöllner für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit meinen Dank auszusprechen.

Ebenso danke ich Frl. Katharina Kirsch für wertvolle Ratschläge.

LEBENS LAUF

Am 27. Juni 1932 wurde ich als Sohn des Lithographs Michael Wagenbrenner in New York geboren. Im Jahre 1954 habe ich im Queens College in New York das Diplom "Bachelor of Science" in Biology-Chemistry erhalten. Anschliessend diente ich in der US Armee. Im Jahre 1955 heiratete ich Catherine Lutz und im Jahre 1956 wurde unsere Tochter Anne geboren.

1958 immatrikulierte ich mich an der Universität München, bestand am Ende des Wintersemesters 1959/60 die ärztliche Vorprüfung und schloss im Juni 1963 mein Studium mit dem Staatsexamen ab.



